PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5:

C07D 207/452, G01N 33/535

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: · WO 90/15798

G01N 33/547

A1

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum: 27. Dezember 1990 (27.12.90)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP90/00957

(22) Internationales Anmeldedatum:

16. Juni 1990 (16.06.90)

(30) Prioritätsdaten:

P 39 19 915.0

19. Juni 1989 (19.06.89)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEH-RINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE).

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HUBER, Erasmus [DE/DE]; St. Willibald 10, D-8911 Unterfinning (DE). KLEIN, Christian [DE/DE]; Blütenstr. 16, D-8120 Weilheim (DE). BATZ, Hans-Georg [DE/DE]; Traubinger-Str. 63, D-8132 Tutzing (DE). ZINK, Bruno [DE/DE]; Seeblickstr. 4, D-8114 Uffing (DE). (74) Anwälte: DAUM, Martin usw. ; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), ES (europäisches Pa päisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent) sches Patent), US.

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: AMINOALKYL MALEIMIDES AND HAPTENE AND ANTIGEN DERIVATIVES THEREOF AND CONJU-GATES WITH PEPTIDES OR PROTEINS

(54) Bezeichnung: AMINOALKYLMALEIMIDE UND DAVON ABGELEITETE HAPTEN- UND ANTIGENDERIVATE SOWIE KONJUGATE MIT PEPTIDEN ODER PROTEINEN

$$\mathbb{R}^{1} \longrightarrow \mathbb{N}_{-A-NH_{2}}$$
 (I)

(57) Abstract

The invention relates to novel aminoalkyl maleimides of general formula (I) in which R₁ and R₂ are the same or different and represent hydrogen or a C1-C4 alkyl group and A is a straight or branched-chain, saturated or unsaturated alkylene chain with 2 to 6 carbon atoms, possibly interrupted by an oxygen or sulphur atom or carbonyl group, and their corresponding acid addition salts. The present invention also relates to the amidoalkyl maleimide derivatives formed from compounds of general formula (I) and immunological conjugates which may be produced by the conversion of amidoalkyl maleimide derivatives with peptides or proteins. The object of this invention is also the corresponding processes for making the compounds of the invention and the use of these conjugates in diagnostic determination methods, especially immunoassays.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neue Aminoalkylmaleimide der allgemeinen Formel (I), in der R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine C1-C4-Alkylgruppe darstellen, und A eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte, gegebenenfalls durch ein Sauerstoff- oder Schwefelatom oder Carbonylgruppe unterbrochene Alkylenkette mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen darstellt, sowie deren entsprechende Säureadditionssalze. Ferner bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die aus Verbindungen der allgemeinen Formel (I) und immunologischen Bindungspartnern gebildeten Amidoalkylmaleimid-Derivate. Außerdem betrifft die Erfindung immunologische Konjugate, die durch Ümsetzung der Amidoalkylmaleimide-Derivate mit Peptiden oder Proteinen hergestellt werden können. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die entsprechenden Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen, sowie die Verwendung dieser Konjugate in diagnostischen Bestimmungsmethoden, insbesondere in Immunoassays.

· BENENNUNGEN VON "DE"

Bis auf weiteres hat jede Benennung von "DE" in einer internationalen Anmeldung, deren internationaler Anmeldetag vor dem 3. Oktober 1990 liegt, Wirkung im Gebiet der Bundesrepublik Deutschland mit Ausnahme des Gebietes der früheren DDR.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	MG	Madagaskar
AU	Australien	Fl	Finnland	ML	Mali
BB	Burbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
8F	Burkina Fasso	GB	Vereinigtes Königreich	NL.	Niederlande
BG	Bulgarien	GR	Gricchenland	NO	Norwegen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IT	Italien	SD	Sudan
CA	Kanada	JP	Japan	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	· KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Schegal
CC	Kongo -	KR	Republik Korea	· SU	Soviet Union
CH	Schweiz	u	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TC	Togo
DΕ	Deutschland, Bundesrepublik	LU	Luxemburg	us	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MC	Monaco	-	Toronigo Seasien Von America

Aminoalkylmaleimide und davon abgeleitete Hapten- und Antigenderivate sowie Konjugate mit Peptiden oder Proteinen

Die Erfindung betrifft neue Aminoalkylmaleimide der allgemeinen Formel I

$$\mathbb{R}^{1} \longrightarrow \mathbb{N}^{1} - \mathbb{A} - \mathbb{N}\mathbb{H}_{2}$$
 (I),

in der R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine C₁-C₄-Alkylgruppe darstellen, und A eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte, gegebenenfalls durch ein Sauerstoff- oder Schwefelatom oder eine Carbonylgruppe unterbrochene Alkylenkette mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen darstellt, sowie deren entsprechenden Säureadditionssalze, mit Ausnahme der Verbindung N-6-Aminohexylmaleimid.

Ferner bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die aus Verbindungen der allgemeinen Formel I und immunologischen Bindungspartner gebildeten Amidoalkylmaleimid-Derivate der allgemeinen Formel II

$$\mathbb{R}^1$$
 \mathbb{N}
 \mathbb{R}^2
 \mathbb{N}
 \mathbb{N}
 \mathbb{R}
 \mathbb{N}
 $\mathbb{N$

in der R₁, R₂ und A die oben angegebenen Bedeutungen haben und Hap, der aus einem eine oder mehrere Carboxylgruppen bzw. aktivierte Carboxylgruppen tragenden immunologischen Bindungspartner durch Amidierung gebildete Rest ist. Als immunologische Bindungspartner kommen beispielsweise Haptene oder Antigene in Frage.

Außerdem betrifft die Erfindung immunologische Konjugate, die durch Umsetzung von Verbindungen der allgemeinen Formel II mit Peptiden oder Proteinen hergestellt werden können. Diese Konjugate . werden im folgenden durch den Begriff Hapten-Peptid- oder Antigen- Peptid-Konjugat umschrieben.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formeln I und II sowie der Peptid- und Protein-Konjugate, und die Verwendung dieser Konjugate in diagnostischen Bestimmungsmethoden, insbesondere in Immunoassays.

In vielen biochemischen Techniken ist die Verknüpfung von zwei sich funktional unterscheidenden Komponenten bzw. Verbindungen von grundlegender Bedeutung. So werden beispielsweise auf dem Gebiet der Affinitätschromatographie an eine feste unlösliche Trägermatrix verschiedenartige Liganden gebunden. Diese Liganden sind in der Lage, die in einer Probe enthaltenen und für diesen betreffenden Liganden spezifischen Substanzen zu erkennen und zu binden. Dadurch ist eine gezielte Abtrennung der in der Probe enthaltenen Verbindungen möglich. Als Liganden kommen beispielsweise Antikörper oder Enzyme in Frage, die ein Antigen oder ein Substrat spezifisch binden.

Zur Verknüpfung von Komponenten im obigen Sinne werden häufig bifunktionelle Reagenzien, die auch als Linker bezeichnet werden, eingesetzt. Diese enthalten in der Regel zwei chemisch reaktive Gruppen, die mit bestimmten Resten der miteinander zu verknüpfenden Komponenten möglichst spezifisch reagieren. Generell unterscheidet man hierbei zwischen hetero-bifunktionellen Reagenzien einerseits, wie z.B. gamma-Maleimido-buttersäure-N-hydroxy-succinimid oder m-Maleimido-benzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS), und homo-bifunktionellen Reagenzien andererseits, wie z.B. N,N'-Bis-(3-maleimidopropionyl)-2-hydroxy-1,3-propandiamin. Die heterobifunktionellen Reagenzien besitzen zwei chemisch unterschiedliche reaktive Gruppen, wie beispielsweise im obigen Fall die Maleimidound die N-Hydroxy-succinimido-Gruppe. Während die Maleimidogruppe sehr spezifisch mit sulfhydrylhaltigen Verbindungen reagiert,

eignet sich die Hydroxysuccinimidogruppe bevorzugt zur Reaktion mit Verbindungen, die eine Aminogruppe enthalten. Auf diese Weise lassen sich auf elegante Art und Weise zwei Komponenten bzw. Verbindungen miteinander verknüpfen, wobei die eine beispielsweise eine Sulfhydrylgruppe enthält und die andere eine Aminogruppe. In analoger Weise dienen die homobifunktionellen Reagenzien, die zwei chemisch gleichartige reaktive Gruppen enthalten, zur Verknüpfung von Komponenten mit identischen funktionellen Gruppen, wie beispielsweise im obigen Fall von Sulfhydrylgruppen.

Je nach Eigenschaft der miteinander zu verknüpfenden Komponenten kommen demnach eine Reihe von solchen bifunktionellen Reagenzien zum Einsatz (Kia-ki Han et al., Int. J. Biochem. 16 (2), 129 - 145 (1984) und R.E. Feeney, Int. J. Peptide Protein Res. 29, 1987, 145 - 161). So ist beispielsweise in Arch. Biochem. Biophys. 203, 774 (1980) die Verwendung von N-6-Aminohexylmaleimid zur Herstellung einer modifizierten Agarose-Festphase für die Affinitätschromatographie beschrieben.

Aus dem Stand der Technik, wie z.B. der europäischen Patentanmeldung EP-A-0,142,193, ist ferner die Herstellung von Immunogenen bekannt, wobei geeignete Antigene, wie Polypeptide, Oligosaccharide oder Oligonukleodtide, an reaktive Gruppen von hydophoben Verbindungen, wie z.B. Phospholipide, gebunden werden, die durch mindestens eine Gruppe von Glykosiden, vorzugsweise Saponine, mit einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil komplexiert werden. Im speziellen ist in Beispiel 4 dieser europäischen Patentanmeldung ein ß-Endorphin-Derivat beschrieben, in dem eine Aminosäure dieses Dodecapeptids durch eine Maleimido-butylamin-gruppe modifiziert ist. Die Anmeldung enthält jedoch keinerlei Angaben, wie ein derartiges Derivat hergestellt werden kann.

Ein weiteres Anwendungsgebiet bifunktioneller Reagenzien ist die Herstellung von Reagenzien für die klinische Diagnostik. Hierbei werden in zunehmendem Maße Bestimmungsverfahren nach dem Prinzip der Immunoassays durchgeführt, die sich durch besonders hohe Empfindlichkeit auszeichnen. Dabei werden oft Konjugate z.B. aus einem Markierungsenzym und einer zu bestimmenden Substanz, dem

sogenannten Analyten, bzw. einer einen Antikörper bindefähigen Substanz, dem sogenannten Antigen, eingesetzt. Diese Konjugate lassen sich vorzugsweise durch den Einsatz von bifunktionellen Reagenzien herstellen.

Ein weiteres Beispiel aus jüngster Zeit ist die auf dem Gebiet der homogenen Immunoassays immer mehr an Bedeutung gewinnende sogenannte CEDIA-Technik (Clinical Chemistry 32/9, 1637 - 1641 (1986); US-4,708,929). Bei dieser diagnostischen Bestimmungsmethode wird ebenfalls von dem Prinzip der Verknüpfung von zwei Verbindungen Gebrauch gemacht. Dabei wird ein Analyt, der im allgemeinen ein Hapten oder ein Antigen sein kann, an eine enzymatisch inaktive Vorläuferstufe des Enzyms B-Galactosidase angeknüpft. Diese inaktive Vorläuferstufe ist ein Peptid und wird in der oben zitierten Literatur auch als Enzymdonor bezeichnet. Mittlerweile sind eine Reihe von verschiedenen Peptiden als Enzymdonoren bekannt, wie z.B. ED4.

Die Durchführung dieses Tests beruht auf folgendem Prinzip: Das Enzym 8-Galactosidase besteht aus vier Untereinheiten, die wiederum aus einer größeren Polypeptidkette, die auch als Enzymakzeptor EA bezeichnet wird, und einer kleineren Peptidkette, Enzymdonor ED genannt, aufgebaut ist. Enzymakzeptor und Enzymdonor sind beide enzymatisch inaktiv, können sich aber spontan zu einem aktiven Tetramer zusammenlagern. Aufgrund der außerordentlich geringen Dissoziationskonstanten des aus Enzymdonor und Enzymakzeptor gebildeten aktiven Enzyms ist die Menge des gebildeten Enzyms direkt proportional zur Menge des vorhandenen Enzymdonors bzw. -akzeptors. Bei der Durchführung von Immunoassays macht man sich die Eigenschaft nun dadurch zu Nutzen, in dem man anstelle des natürlichen Enzymdonors einen chemisch modifizierten Enzymdonor einsetzt. Dieser zeichnet sich dadurch aus, daß ein Analyt kovalent an funktionelle Gruppen des Enzymdonors geknüpft ist. Als Analyte kommen beispielsweise Haptene oder Antigene in Frage.

Das bei der immunologischen Bestimmungsmethode verwendete Testsystem enthält außerdem einen den jeweiligen Analyten spezifisch
Immunogen erkennenden Antikörper. Hierbei differenziert der
Antikörper in der Regel nicht zwischen freien und kovalent an den
Enzymdonor gebundenen Analyten. Der Antikörper ist in einer Menge
vorhanden, die ausreicht, um die im Testsystem vorliegenden mit
dem Analyten modifizierten Enzymdonor-Konjugate vollständig zu
binden. Dadurch wird die spontane Assoziation des Enzymdonors und
des Enzymakzeptors zum aktiven Enzym verhindert.

Die Reaktion zur Bestimmung der Konzentration eines Analyten wird nun derart durchgeführt, daß eine definierte Menge der zu bestimmenden Probe zu dem oben beschriebenen Testsystem zugefügt wird. Da es sich bei diesem Reaktionstyp um einen kompetitiven Test handelt, binden die vorhandenen Antikörper, die gegen den Analyten gerichtet sind, sowohl die aus der Probe kommenden freien Analyten als auch einen Teil der mit dem Analyten markierten Enzymdonoren. Der durch die Verdrängungsreaktion durch den freien Analyten ausgelöste freie Anteil des markierten Enzymdonors assoziiert dann spontan mit dem Enzymakzeptor zum enzymatisch aktiven B-Galaktosidase-Tetramer, dessen Konzentration direkt proportional zu der Konzentration des aus der Probe stammenden. Analyten ist. Die Menge bzw. die volumenspezifische Aktivität des durch diese spontane Assoziation gebildeten Enzyms B-Galactosidase wird durch Hydrolyse eines geeigneten Enzymsubstrates, beispielsweise von o-Nitrophenyl-8-D-galactopyranosid oder Chlorphenolrot-B-D-galactopyranosid und Freisetzung des entsprechenden Chromophors gemessen.

Bei der oben dargestellten erforderlichen Verknüpfung zwischen Immunogen (Analyt) und Enzymdonor besteht das Problem, daß die Modifizierung des Enzymdonors nur an solchen Stellen im Molekül erfolgen darf, die für die Erkennung zwischen Enzymdonor und Enzymakzeptor nicht von Bedeutung sind. Ansonsten wäre die Assoziation zum enzymatisch aktiven Enzymkomplex gestört und der gemessene Wert für das zu bestimmende Hapten würde ein falsches Ergebnis vortäuschen.

Es ist literaturbekannt, daß als Hapten-Enzymdonor-Konjugatbeispielsweise Maleimidyl-benzcarbamyl-digoxigenin eingesetzt werden ,
kann (Clin.Chem. 32, 1637 (1986)). Die Bindung des Haptens Digoxigenin an den Enzymdonor erfolgt durch Umsetzung mit 3-Maleimido- ,
benzoesäure-isocyanat. Die Verknüpfung seitens des Enzymdonors mit
dem oben gebildeten Digoxigenin-Derivat erfolgt durch Reaktion
einer Sulfhydrylgruppe der Aminosäure Cystein am Enzymdonor mit
der Maleimidogruppe.

Das in dem oben genannten Fall eingesetzte bifunktionelle Reagens hat jedoch den Nachteil, daß einerseits die vorhandene Urethan-Bindung hydrolyseempfindlich ist und das Reagenz somit nicht hinreichend stabil genug ist, und daß ferner durch den vorhandenen Benzcarbamylrest ein Teil der Bindungsaktivität der Antikörper gegen den Linker selbst, d. h. gegen das Brückenmolekül zwischen Hapten und Enzymdonor im Immunogen gerichtet ist. Dies bedeutet, daß bei der Antigen-Antikörper-Reaktion häufig mit Kreuzreaktivitäten zu rechnen ist, die im immunologischen Test zu Ungenauigkeiten bei der Bestimmung führen.

Außerdem besteht das Problem, daß die verwendeten bifunktionellen Reagenzien möglichst stabil und einfach herstellbar sein sollten. Ferner ist es wünschenswert, daß sie mit Haptenen oder Antigenen unter möglichst milden Bedingungen reagieren, und somit die zur Immunisierung und Gewinnung von Antikörpern als Immunogene verwendbaren Hapten-Peptid-Derivate auf schonende und einfache Weise hergestellt werden können.

Heterobifunktionelle Reagenzien mit einer Maleimidogruppe haben jedoch häufig den Nachteil, daß sie sehr reaktiv sind und leicht zu Maleinsäure-derivaten hydrolysieren. Aufgrund ihrer hohen Reaktivität sind sie oft wenig spezifisch für Sulfhydrylgruppen, insbesondere wenn sie in stöchiometrischen Mengen eingesetzt werden. Diese geringe Spezifität kann zu komplexen Reaktionsmischungen führen, die entstehen, wenn die Maleimidogruppe mit anderen reaktiven Gruppen der zu verknüpfenden Peptide oder Proteine, wie z.B. mit Aminen, reagieren. Derartige Nebenreaktionen

führen zu unerwünschten Reaktionsmischungen, die häufig schwierig zu trennen sind. Höchste Reinheit der hergestellten Konjugate ist jedoch erforderlich, um durch Immunisierung Antikörper mit möglichst hoher Spezifität und geringer Kreuzreaktivität zu erhalten.

Es bestand daher die Aufgabe, neue bifunktionelle Reagenzien zur Verfügung zu stellen, die die oben genannten Nachteile nicht aufweisen.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I als heterobifunktionelle Reagenzien vorteilhaft eingesetzt werden können. Insbesondere hat sich
gezeigt, daß die zwischen der Maleimido- und der Aminogruppe
befindliche Gruppe A für eine geringe Kreuzreaktivität der mit
Hilfe der Hapten-Peptid-Konjugate hergestellten Antikörper verantwortlich ist. Dies trifft insbesondere zu für die kurzkettigen
Derivate mit einer Kettenlänge in A von 2-5, insbesondere 2, 3
oder 4 Atomen.

 \mathbb{R}^1 und \mathbb{R}^2 in der Formel I können gleich oder verschieden sein und jeweils ein Wasserstoffatom oder eine C_1 - C_4 -Alkylgruppe, wie z.B. die Methyl-, Ethyl- oder Isopropylgruppe bedeuten. Bevorzugt stellen \mathbb{R}^1 und \mathbb{R}^2 jedoch ein Wasserstoffatom dar.

Die Gruppe A bedeutet eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Alkylengruppe mit 2-6, vorzugsweise 2-4 C-Atomen, die gegebenenfalls durch ein Sauerstoff- oder Schwefelatom oder durch eine Carbonylgruppe unterbrochen sein kann. In diesem Sinne kommen beispielsweise die folgenden Bedeutungen in Frage: $A=-(CH_2)_n-; -(CH_2)_m-CH(CH_3)-(CH_2)_0-; -(CH_2)_m-C(CH_3)_2-(CH_2)_0-; -(CH_2)_m-X-(CH_2)_0- mit X=0,S,CO; -(CH_2)_m-CH=CH- mit n=2-6 und m=o=1-4 und m+o=2-5. Bevorzugt bedeutet A die Gruppen -(CH_2)_n- mit n=2,3,4 oder 5 und -CH_2-0-CH_2-, -CH_2-S-CH_2-, -CH_2-CO-CH_2-.$

Säureadditionssalze der Amine sind Salze mit organischen oder anorganischen Säuren, wie z.B. Essigsäure oder Salzsäure.

Verbindungen der Formel I können beispielsweise dadurch hergestellt werden, indem man ein Diamin der allgemeinen Formel III

$$H_2N-A-NH_2$$
 (III),

in der A die oben angegebene Bedeutung hat, in eine Verbindung der allgemeinen Formel IV

$$H_2N-A-NH-Y$$
 (IV),

überführt, wobei Y eine für die Aminogruppe geeignete leicht abspaltbare Schutzgruppe, beispielsweise die tert.-Butyl-oxycarbonylgruppe darstellt, und anschließend die Verbindung der allgemeinen Formel IV mit einer Verbindung der allgemeinen Formel V

$$\mathbb{R}^{1} \longrightarrow \mathbb{N}^{-2}$$

$$\mathbb{R}^{2} \longrightarrow \mathbb{N}^{-2}$$

$$(V),$$

in der R_1 und R_2 die oben angegebenen Bedeutungen haben und Z eine reaktive Gruppe bedeutet, nach an sich bekannten Verfahren umsetzt, und anschließend die Schutzgruppe Y wieder abspaltet.

Die Umsetzung der Diamine der allgemeinen Formel III mit geeigneten Schutzgruppenreagenzien, wie z.B. Di-tert.-butyl-dicarbonat, tert.-Butoxycarbonylchlorid oder N-(tert.-Butoxy-carbonyl-oxy)phthalimid, erfolgt in Lösungsmittel, wie z.B. Dioxan, Tetrahydrofuran, Dimethylformamid oder Ethanol bei Temperaturen von - 20 °C bis + 100 °C, vorzugsweise bei 0 °C bis + 25 °C nach an sich bekannten Methoden.

Die Umsetzung der Verbindungen der Formel IV mit Verbindungen der Formel V werden vorzugsweise in basischen Lösungen bei Temperaturen von - 20 °C bis + 80 °C durchgeführt. Als reaktive Gruppe Z kommen solche in Frage, die sich durch Umsetzung mit Aminen leicht abspalten lassen, wie z.B. Alkoxycarbonylgruppen, beispielsweise die Ethoxycarbonylgruppe.

Die neuen Verbindungen der Formel I finden als heterobifunktionelle Reagenzien insbesondere zur Herstellung von Konjugaten Verwendung. Als Konjugate kommen beispielsweise Hapten-Peptid-, Hapten-Protein-, Antigen-Peptid-, Antigen-Protein- oder Antikörper-Effektor-Konjugate in Frage. Im Fall der Antikörper-Effektor-Konjugate wird beispielsweise ein Antikörper kovalent an ein Effektormolekül gebunden, wobei der Effektor ein Analyt, Wirkstoff, Toxin oder auch ein signalproduzierendes Enzym sein kann.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der Formel II, in der Hap repräsentativ für einen Bindungspartner steht, der sich als Analyt zum Einsatz bei immunologischen Bestimmungsverfahren eignet. Solche Bindungspartner sind beispielsweise Haptene oder Antigene, die mindestens eine Carboxylgruppe tragen, oder in ein carboxylgruppentragendes Derivat überführt wurden, wie z.B. die Haptene Cortisol, Theophyllin oder Digoxigenin. Antiqene können Proteine oder Peptide sein. Es kommen jedoch prinzipiell für die Gruppe Hap alle solche Substanzen in Frage, für die spezifisch gegen sie gerichtete Antikörper gewonnen werden können. Insbesondere geeignet sind solche, die zur Durchführung von Bestimmungsmethoden nach der oben beschriebenen CEDIA-Technik verwendbar sind. Diese Substanzen können insbesondere Analyte sein, d.h. solche Verbindungen, die im Serum von Patienten vorkommen und deren Bestimmung von diagnostischem Interesse ist.

Generell werden unter dem Begriff "Haptene" solche Mokeküle verstanden, die für die Bildung von Antikörpern nicht direkt sondern "mittelbar über die Bindung an einen geeigneten immunologischen Träger geeignet sind. Beispielsweise seien die folgenden Haptene "genannt: Phenobarbital, Diphenylhydantoin, Carbamazepin, Valproinsäure, Thyroxin (T4), Triiodthyronin (T3), Östron, Östradiol, Progesteron, Testosteron, Aldosteron, Folsäure, Methyltetrahydrofolsäure oder Cyancobalamin (Vitamin B12).

Zur Herstellung der Amidoalkylmaleimid-Derivate der allgemeinen Formel II kommen die oben unter Hap definierten Haptene oder Antigene in Frage. Für die Umsetzung der Maleimide der allgemeinen Formel I mit geeigneten Hap-Derivaten ist es zweckmäßig, die in Hap vorhandene Carboxylgruppe zunächst durch Überführung in ein reaktives Derivat zu aktivieren. Dies geschieht beispielsweise durch Umsetzung mit N-Hydroxysuccinimidester in Gegenwart eines Kondensationsmittels, wie z.B. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid. Der auf diese Weise hergestellte Hap-Carbonsäure-N-hydroxysuccinimidester wird dann direkt mit dem Maleimidderivat der allgemeinen Formel I in hoher Ausbeute zu den entsprechenden Maleimid-Hapten-Derivaten der allgemeinen Formel II umgesetzt. Es ist jedoch prinzipiell auch möglich, andere Aktivierungsgruppen der Carboxylgruppe zu verwenden, wie z.B. die Imidazolyl-, Hydroxybenzotriazolyl-, p-Nitrophenyl- oder Isobutoxycarbonylgruppen.

In bevorzugten Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel II ist der immunologische Bindungspartner ein Hapten, wie z. B. ein Steroidhormon oder ein Xanthinderivat, beispielsweise Cortisol, Theophyllin oder Digoxigenin. Prinzipiell können jedoch alle diejenigen Haptene eingesetzt werden, die eine reaktive Carboxylgruppe tragen. Die

Carboxylgruppe kann in freier Form vorliegen oder in Form von aktivierten Derivaten, wie beispielsweise Anhydriden, Estern oder Amiden. Es ist jedoch auch möglich, solche Haptene als Bindungspartner einzusetzen, die ursprünglich keine Carboxylgruppe enthielten, wenn durch chemische Modifizierung die entsprechende Carboxylgruppe nachträglich in das Hapten eingeführt wird. Entsprechende Modifizierungsreaktion sind aus dem einschlägigen Stand der Technik bekannt.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Verbindungen der allgemeinen Formel II zur Verfügung gestellt, in denen das Hapten ein Steroidhormon ist. Der Nachweis von Steroidhormonen, wie z.B. Östrogen, Testosteron, Cortisonen und Herzglycosiden, denen alle das Steroidgrundgerüst gemeinsam ist, spielt in der Diagnostik eine bedeutende Rolle. Die Zurverfügungstellung von Antikörpern gegen Steroidhormone bzw. gegen die entsprechenden Hapten-Peptid-Konjugate für die Durchführung von Immunoassays ist daher wünschenswert.

Es hat sich erwiesen, daß durch die Derivatisierung der Haptene zu den Verbindungen der allgemeinen Formel II das Epitop des Haptens nicht beeinträchtigt wird, so daß ein gegen das jeweilige in der zu bestimmenden Probe vorhandene freie Hapten gerichteter Anti-körper auch das entsprechend modifizierte Hapten-Peptid-Konjugat in gleichem Maße erkennt.

Ebenso hat sich gezeigt, daß die derivatisierten Hapten-Peptid-Konjugate, die durch Umsetzung von Verbindungen der Formel II mit sulfhydrylgruppenhaltigen Peptiden oder Proteinen erhalten werden, ohne weitere Beeinträchtigung der Bindungseigenschaften mit dem Enzymakzeptor EA zu den Tetramer-Komplexen der ß-Galactosidase assoziieren. Diese wiederum zeigen durch die im Prinzip vorhandene Derivatisierung des Enzyms keine nachteilige Beeinflussung der enzymatischen Aktivität, und spalten die in Frage kommenden Substrate in gleicher Weise wie die unmodifizierte ß-Galactosidase.

Bei der Verwendung für die Immunisierung werden die Hap-Derivate der allgemeinen Formel II eingesetzt. Das Haptenderivat wird in den zur Antikörperbildung geeigneten Organismus in Abständen mehrmals injiziert. Es kommt dabei zur Bildung von Antikörpern, die in , sehr hohem Prozentsatz nun gegen das Hapten gerichtet sind, und keine Kreuzreaktivität mit den Verknüpfungsgruppierungen aufweisen. Die Antikörper werden dann in an sich bekannter Weise aus dem Organismus isoliert und gereinigt. Die erfindungsgemäßen Haptenderivate der allgemeinen Formel II eignen sich sowohl zur Immunisierung für die Herstellung polyklonaler Antikörper als auch zur Herstellung monoklonaler Antikörper.

überraschenderweise gelingt es durch Verwendung der erfindungsgemäßen Haptenderivate der allgemeinen Formel II, Antikörper zu erhalten, die sehr wenig Kreuzreaktivität mit der Brückenverbindung aufweisen. Die erhaltenen Antikörper haben eine hohe Affinität zu dem Hapten. Bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Haptenderivate zur Immunisierung werden hohe Antikörpertiter erhalten. Weiterhin sind die erfindungsgemäßen Hapten-Peptid-Konjugate besonders gut geeignet zum Einsatz in Immunoassays. Da die Antikörper zu dem Brückenmolekül keine oder eine nur sehr geringe Affinität aufweisen und daher das Hapten sehr spezifisch binden, erhält man mit diesen Konjugaten bei der Verwendung in Immunoassays sehr genaue Ergebnisse.

Die erfindungsgemäßen Haptenderivate der allgemeinen Formel II besitzen den Vorteil, daß sie einerseits die Struktur des freien Haptens weitgehend unverändert beinhalten, andererseits im Vergleich zu Derivaten, die z.B. aus dem Stand der Technik bekannt sind, im Brückenmolekül eine charakteristische Änderung aufweisen. Die Verwendung der erfindungsgemäßen Haptenderivate ermöglicht deshalb die Durchführung heterologer Linker-Techniken auf einfache und effektive Weise.

WO 90/15798

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Konjugate, die durch Umsetzung der Verbindungen der allgemeinen Formel II mit Peptiden und Proteinen hergestellt werden können. Als Peptide und Proteine kommen vorzugsweise solche in Frage, die eine Sulfhydylgruppe bzw. eine Cysteingruppe enthalten, die mit der Maleimidogruppe der Verbindungen der Formel II reagieren. Die Herstellung solcher Derivate erfolgt nach an sich bekannten Methoden der chemischen Modifizierung von Proteinen. Vorzugsweise werden jedoch Peptide, insbesondere die in der oben beschriebenen CEDIA-Technik verwendbaren Enzymdonatoren ED eingesetzt. Die Modifizierung von Peptiden oder Proteinen erfolgt nach an sich bekannten Verfahren in geeigneten Puffern, z.B. Phosphatpuffer, bei Temperaturen zwischen 0°c und 40°C, vorzugsweise bei 15-25°C, durch Inkubation mit Verbindungen der Formel II über einen Zeitraum von 1-24h. Die Herstellung verschiedener ED-Derivate ist aus US 4,708,929 bzw. Clin. Chem. 32 (9), 1986, 1637 - 1641 bekannt, bzw. sind bei Microgenics Corp., Concord, California (USA) erhältlich.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Hapten-Peptid-Konjugates bei der Durchführung von Immunoassays.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung anhand von konkreten Ausführungsbeispielen:

- 14 -

Beispiel 1

a) N-(tert.-Butyloxycarbonyl)-ethan-1,2-diamin

12 g (0.2 mol) Ethylendiamin werden in 200 ml Dioxan/Wasser (50/50 v/v) gelöst. Innerhalb von 1.5 h wird unter Rühren und Kühlung im Eisbad eine Lösung von 21.8 g (0.1 mol) Di-tert.-butyl-dicarbonat in 100 ml Dioxan zugetropft. Man läßt 1 h bei Raumtemperatur weiterrühren, dann wird mit 500 ml Wasser verdünnt und mit 1 l Essigester extrahiert. Die organische Lösung wäscht man dreimal mit je 200 ml Wasser und extrahiert mit zweimal je 300 ml 0.1 n HCl. Die vereinigten HCl-Phasen werden mit 2 n NaOH auf pH 10.0 gestellt und mit 600 ml Essigester extrahiert. Die organische Lösung wird nochmals mit 300 ml Wasser gewaschen, mit 20 g Na₂SO₄ getrocknet und im Wasserstrahlvakuum eingedampft.

Ausbeute: 1.35 g zähes Öl (entspr. 8.4 % d.Th. bez.auf Ditert.-butyl-dicarbonat).

DC: Kieselgel, Methanol/Essigester (66/33 v/v), Besprühen mit Ninhydrin-Spray (Fa. Merck, Darmstadt); $R_f = 0.14$.

b) N-(tert.-Butyloxycarbonyl)pentan-1,5-diamin-Acetat

20.4 g (0.2 mol) Pentan-1.5-diamin werden in 200 ml Dioxan/Wasser (50/50 v/v) gelöst. Innerhalb von 1.5 h wird unter
Rühren und Kühlung im Eisbad eine Lösung von 21.8 g (0.1 mol)
Di- tert.-butyl-dicarbonat in 100 ml Dioxan zugetropft. Man
läßt 2 h bei 0°C und anschließend 18 h bei 20°C weiterrühren,
dann wird mit 500 ml Wasser verdünnt und mit 1 l Essigester
extrahiert. Die organische Lösung wäscht man zweimal mit je 200 °
ml Wasser, trocknet mit 50 g Na₂So₄ und dampft am Rotationsverdampfer ein. Der halbfeste Rückstand wird mit 200 ml 10%iger
Essigsäure digeriert und das ungelöste Bis-BOC-pentan-1,5diamin abgesaugt. Man dampft das Filtrat ein und trocknet das
verbleibende zähflüssige Produkt 4-6 h am Hochvakuum.

Ausbeute: 11.6 g (entspr. 44% d. Th. bez. auf die Di-tert.-butyl-dicarbonat).

DC: Kieselgel, Methanol/Chloroform/Ammniak 45/45/10 (v/v/v) Besprühen mit Ninhydrin-Spray (Fa. Merck, Darmstadt); R_f =0.65.

Beispiel 2

a) N-(tert-Butyloxycarbonyl)-2-(N-maleinimido)ethylamin

0.8 g (5 mmol) der nach Beispiel la hergestellten Verbindung löst man in 25 ml gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung. Die Lösung wird über ein Falten-filter filtriert und auf 0°C gekühlt. Anschließend gibt man unter Rühren 0.84 g (5 mmol) N- (Ethoxycarbonyl) maleinimid (hergestellt nach der Methode von 0. Keller und J. Rudinger, Helv.Chim.Acta 58 (1975), 531-541) zu und läßt 15 min bei Raumtemperatur weiterrühren. Hierbei löst sich das N-(Ethoxycarbonyl) maleinimid nach kurzer Zeit vollständig auf, während die Titelverbindung im Verlauf der Umsetzung ausfällt. Es werden 40 ml THF zugegeben und 45 min bei Raumtemperatur weitergerührt. Danach stellt man mit 1 n HCl auf pH 6.0, extrahiert mit zweimal je 50 ml Essigester und trocknet den Extrakt mit 5 g Na₂SO₄. Nach Eindampfen im Wasserstrahlvakuum wird die Titelverbindung als farbloser, fester Rückstand erhalten.

Ausbeute: 1.1 g (92 % d.Th.).

DC: Kieselgel, Chloroform/Essigester (66/33 v/v), Besprühen mit 0.1 % KMnO₄-Lsg.; $R_{\rm f}$ = 0.50.

b) N-(tert.-Butyloxycarbonyl)-5-(N-maleinimido)pentylamin

13.1 g (50 mmol) der nach Beispiel 1b hergestellten Verbindung löst man in 250 ml gesättigter Natriumcarbonat-Lösung. Die Lösung wird über ein Faltenfilter filtiert und auf 0°C gekühlt. Nun gibt man unter Rühren 8.4 g (50 mmol) N-(Ethoxycarbonyl)-maleinimid zu und läßt 15 min bei Raumtemperatur weiterrühren, wobei sich das N-(Ethoxycarbonyl)-maleinimid nach kurzer Zeit vollständig auflöst. Anschließend gibt 400 ml Tetrahydrofuran und zusätzlich 250 ml gesättigte Natriumcarbonat-Lösung zu und läßt 1 h weiterreagieren. Dann wird die Lösung mit 2 x 500 ml Essigester extrahiert, der Extrakt mit 500 ml Wasser gewaschen und mit 50 g Na2So4 getrocknet. Nach dem Eindampfen am Rotationsverdampfer erhält man das Produkt als zähes öl das am Hochvakuum getrocknet wird.

Ausbeute: 9.6 g (entspr. 68% d. Th.)

DC: Kieselgel, n-Butanol/Eisessig/Wasser 40/10/50 (v/v/v), Besprühen mit 0.1% KMnO₄-Lsg.; R_f =0.85.

Beispiel 3

a) 2-(N-Maleinimido) ethylamin-Hydrochlorid

0.96 g (4 mmol) der BOC-Aminoverbindung aus Beispiel 2a werden in 25 ml 2 m HCl in Dioxan gelöst und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Innerhalb 30 - 60 min beginnt das Produkt 4 auszufallen. Man läßt 24 h bei Raumtemperatur stehen, dann saugt man das Kristallisat ab, wäscht mit ca. 10 ml Essigester nach und trocknet im Exsikkator über CaCl₂ und Paraffin.

Ausbeute: 0.58 g farbloses, feinkristallines Pulver (82 % d.Th.).

DC: Kieselgel, n-Butanol/Eisessig/Wasser (40/10/50 v/v/v), Besprühen mit Ninhydrin-Spray (Fa. Merck, Darmstadt); $R_f = 0.22$.

C₆H₉ClN₂O₂ (176.60); Ber.: C 40.81 H 5.14 N 15.86 Gef.: C 40.60 H 5.29 N 15.46

b) 5-(N-Maleinimido) pentylamin-Hydrochlorid

8.46 g (30 mmol) der nach Beispiel 2b hergestellten BOC-Aminoverbindung werden in 100 ml 2 m HCL in Dioxan gelöst und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Innerhalb 30-60 min beginnt das Produkt auszufallen. Man läßt 24 h bei Raumtemperatur stehen, dann saugt man das Kristallisat ab, wäscht mit ca 50 ml Essigester nach und trocknet im Exsikkator über CaCl₂ und Paraffin.

Ausbeute: 4.7 g farbloses, feinkristallines Pulver (entspr. 72% d.Th.)

DC: Kieselgel, n-Butanol/Eisessig/Wasser (40/10/50 (v/v/v), Besprühen mit Ninhydrin-Spray (Fa. Merck, Darmstadt); Rf0.22

C₉H₁₅ClN₂O₂(218.69); Ber.: C 49.43 H 9.91 N 12.81 Gef.: C 49.19 H 9.99 N 12.59

Beispiel 4 Herstellung von Hapten-Carbonsäure-Derivaten

Die folgenden Haptencarbonsäuren wurden nach Literaturvorschriften hergestellt:

a) <u>Cortisol-3-(O-carboxymethyl)-oxim</u>

aus Cortisol und Carboxymethylhydroxylamin-hemihydrochlorid in Ethanol

Lit.: A. Tsuji et al., Steroids 24 (1974), 739-51

b) 3-0-Succinvl-Digoxigenin

aus Digoxigenin und Bernsteinsäureanhydrid

Lit.: G.C. Oliver et al., J.Clin.Invest. 47 (1968), 1035-1042.

HOOC-
$$(CH_2)_2$$
-CO-O

H

OH

OH

OH

c) Dioxin-4'''-qlutaryl-hydroxysuccinimidester

aus Digoxin und Glutaryl-w-orthotrimethylester-w'-hydroxysuccinimidester in THF.

Lit.: H.-G. Batz et al., DE-A-2,537,129 bzw. US-4,133,949, US- 4-436,828

d) 8-(3-Carboxypropyl)-theophyllin

aus 4,5-Diamino-1,3-dimethylpyrimidin-2,6-dion und Glutansäure-anhydrid.

C.E. Cook et al., Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 13 (1976), 497-505

$$\begin{array}{c|c}
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & \\
 & & & \\
 & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & & \\
 & & \\$$

e) 5-Ethyl-5-phenyl-1-(3-carboxypropyl)barbitursäure (1-(3-Carboxypropyl)-phenobarbital) aus Natriumphenobarbital und 4-Brombuttersäure-ethylester C.E. Cook et al., Quantitative Analogical Studies in Epilepsy P. Kellaway und Ingemar Petersen (ed.), Raven Press, New York 1976, S.39-58.

$$H_{3}C \longrightarrow 0 \qquad \qquad (X)$$

Beispiel 5 Hapten-Carbonsäure-N-hydroxysaccinimidester

Allgemeine Herstellvorschrift

0.5 mmol der nach Beispielen 4 a,b,d,e hergestellten Hapten-Carbonsäuren werden zusammen mit 63 mg (0.55 mmol) N-Hydroxy-succinimid in 10 ml absolutem DMF gelöst und mit 1.13 mg (0.55 mmol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Man läßt 4 h bei Raumtemperatur rühren, filtriert und dampft die Lö-sung im Vakuum ein. Der Rückstand wird in 20 ml THF aufgenommen und eventuell unlösliche Reste an N,N'-Dicyclohexylharnstoff durch Filtration entfernt. Die Lösungen der Hapten-Carbonsäure-N-hydroxysuccinimidester werden in dieser Form zur nächsten Stufe eingesetzt.

Beispiel 6

Hapten-Carbonsaure-[2-(N-maleinimido)ethylamide]

Allgemeine Vorschrift:

Zur Lösung der aktivierten Haptene aus Beispiel 5 werden 88 mg (0.5 mmol) 2-(N-maleinimido) ethylamin gegeben. Unter Rühren werden 51 mg (0.5 mmol) Triethylamin zugetropft, danach läßt man 6 h bei Raumtemperatur weiterrühren. Die Lösung wird im Vakuum eingedampft und die Hapten-Maleinimid-Verbindung II A-C durch Säulenchromatographie an einer Kieselgel-Säule (2.5 x 30 cm) mit einem geeigneten Lösungsmittel gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen werden gesammelt und im Vakuum eingedampft.

Die Lösung der nach Beispiel 5d hergestellten Verbindungwird im Vakuum auf die Hälfte eingeengt und der Niederschlag abfiltriert. Dann wird das Lösungsmittel im Vakuum vollends entfernt. Der Rückstand wird mit Isopropanol digeriert, das feste Produkt abgesaugt und im Exsikkator getrocknet.

Es werden folgende Produkte erhalten:

a) 2-(N-Maleinimido) ethylamid von Cortisol(3-O-Carboxymethyl)oxim

Eluent: Essigester/Methanol (90/10 v/v).

Ausbeute: 180 mg (64 % d.Th.).

DC: Kieselgel, Essigester/Methanol (90/10 v/v); $R_f = 0.60$.

C₂₉H₃₉N₃O₈(557.63); Ber.: C 62.46 H 7.05 N 7.54 Gef.: C 62.20 H 7.10 N 7.31

b) 2-(N-Maleinimido)ehtylamid von 3-O-Malonyl-Digoxigenin Eluent: Essigester/Petrolether/Ethanol (40/40/20 v/v/v). Ausbeute: 145 mg (47 % d.Th.). DC: Kieselgel, Essigester/Petrolether/Ethanol (40/40/20 v/v/v); $R_f = 0.58$.

C₃₃H₄₄N₂O₉ (612.71); Ber.: C 64.69 H 7.24 N 4.57 Gef.: C 64.60 H 7.44 N 4.29

c) 2-(N-Maleinimido)ehtylamid von Digoxin-4'''-glutaryl-hydroxysuccinimidester

Eluent: Essigester/Petrolether/Methanol (40/40/20 v/v/v). Ausbeute: 220 mg (43 % d.Th.).

DC: Kieselgel, Essigester/Petrolether/Methanol (40/40/20 v/v/v); R_f = 0.48.

 $^{\text{C}_{52}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_{18}}$ (1017.15); Ber.: C 61.40 H 7.53 N 2.75 Gef.: C 61.31 H 7.68 N 2.50

d) 2-(N-Maleinimido) ethylamid von 8-(3-Carboxypropyl) - theophyllin Ausbeute: 120 mg (62 % d.Th.).

DC: Kieselgel, Butanol/Eisessig/Wasser (40/10/50 v/v/v); $R_f = 0.79$.

C₁₇H₂₀N₆O₅ (388.38); Ber.: C 52.57 H 5.19 N 21.64 C 52.41 H 5.01 N 21.74

e) 2-(N-Maleinimido) ethylamid von 1-(3-Carboxypropyl)-phenobarbital

Ausbeute: 95 mg (44% d.Th.)

DC: Kieselgel, Essigester/Methanol (90/10 v/v); R_f=0.83 C₂₂H₂₄N₄O₆ (440.46); Ber.: C 59.99 H 5.49 N 12.72 59.60 5.79 12.55

Beispiel 7

Herstellung von Hapten-Peptid-Konjugaten

200 /ug Enzymdonor ED4, beschrieben in US P 4,708,929
(24.11.1987), werden in 150 ml 0.05 m Natriumphosphat-Puffer, pH
6.5, gelöst und mit 20 mg aktiviertem Hapten II A-D IN 20 ml
Acetonitril versetzt. Man läßt die Lösung 4 h bei Raumtemperatur
rühren. Das Konjugat wird durch HPLC an einer C-18 Säule (Dynamax
60A 8 , 4.6 x 250 mm; Gradient: 20 - 100 % B, B=Acetonitril/Wasser
65/35 v/v) aufgereinigt. Die Retensionszeit des nichtkonjungierten
ED4 liegt hierbei bei 25.35 min. Die entsprechenden Fraktionen
werden gesammelt und gegen 5 l Wasser dialysiert. Die Lösung des
Konjugats kann in dieser Form zu den, in US P 4,708,929 genannten,
oder alternativen, immunologischen Testmethoden verwendet werden.

So wurden erhalten:

- a) Theopyhllin-8-essigsäure-[2-(N-Maleinimido)ethylamid]-ED4-Konjugat Ausbeute: 12 /ug; Retensionszeit (HPLC): 26.91 min.
- b) Phenobarbital-1-buttersäure-[2-(Maleinimido) ethylamid]-ED4-Konjugat Ausbeute: 155 /ug; Retensionszeit (HPLC): 23.78 min.

Beispiel 8

Synthese von Cortisol-3-carbonsaure-[2-(N-maleinimido)ethylamid]-B-Gal-Immunogen

500 mg B-Gal (Boehringer Mannheim Nr. 570 079) werden bei 20°C in 50 ml 0.1 n Kaliumphosphatpuffer pH 6.0 gelöst und mit 110 mg der nach Beispiel 4a hergestellten Cortisol-Verbindung in 10 ml Dioxan unter kräftigem Rühren tropfenweise versetzt. Nach beendeter Zugabe läßt man ca. 16 h weiterrühren, dann wird die Lösung auf eine AcA 202 Ultrogel-Säule (800 ml Volumen) aufgegeben und mit 0.01 n Kaliumphosphatpuffer pH 7.0, 0.9% NaCl eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen werden gesammelt und die Konzentration durch UV-Absorption bei 280 nm (Proteinkonzentration = E x 1.9 mg/ml) bestimmt. Die Ausbeute an Immunogen liegt typischerweise bei 350 bis 450 mg. Das Proteinkonjugat wird lyophilisiert und bei -20°C aufbewahrt.

<u>Patentansprüche</u>

1. Aminoalkylmaleimide der Formel I

$$\mathbb{R}^{1} \longrightarrow \mathbb{N} - \mathbb{A} - \mathbb{N}\mathbb{H}_{2}$$

$$\mathbb{R}^{2} \longrightarrow \mathbb{N} - \mathbb{A} - \mathbb{N}\mathbb{H}_{2}$$

in der R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine C₁-C₄-Alkylgruppe bedeuten, und A eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte, gegebenenfalls durch ein Sauerstoff- oder Schwefelatom oder eine Carbonylgruppe unterbrochene Alkylengruppe mit 2-6 C-Atomen darstellt, sowie deren Säureadditionssalze, mit Ausnahme der Verbindung N-6-Aminohexylmaleimid.

- 2. Aminoalkylmaleimide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß entweder R_1 oder R_2 Wasserstoff bedeutet.
- 3. Aminoalkylmaleimide gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß A eine geradkettige Alkylenkette mit 2-5 C-Atomen darstellt.
- Verfahren zur Herstellung von Aminoalkylmaleimiden nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Diamin der allgemeinen Formel III

$$H_2N-A-NH_2$$
 (III),

in der A die oben angegebene Bedeutung hat, in eine Verbindung der allgemeinen Formel IV

$$H_2N-A-NH-Y$$
 (IV),

überführt, wobei Y eine leicht abspaltbare Schutzgruppe darstellt, und anschließend die Verbindung der allgemeinen Formel IV mit einer Verbindung der allgemeinen Formel V

$$\mathbb{R}^1$$
 \mathbb{N} $-\mathbb{Z}$ \mathbb{V} ,

in der R_1 und R_2 die oben angegebenen Bedeutungen haben und Z eine reaktive Gruppe bedeutet, nach an sich bekannten Verfahren umsetzt, und anschließend die Schutzgruppe Y wieder abspaltet.

5. Amidoalkyl-maleimide der allgemeinen Formel II

$$\mathbb{R}^1$$
 $\mathbb{N}^{-A-NH-CO-Hap}$
(II),

in der Hap der aus einem eine oder mehrere Carboxylgruppen oder Carboxylderivate tragenden Hapten oder Antigen durch Amidierung gebildete Rest ist, R_1 und R_2 gleich oder verschieden sind und eine C_1 - C_4 -Alkylgruppe oder ein Wasserstoffatom bedeuten, und A eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte, gegebenenfalls durch ein Sauerstoff- oder Schwefelatom oder Carbonylgruppe unterbrochene Alkylengruppe mit 2-6 C-Atomen darstellt.

- 6. Amidoalkyl-maleimide nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Hapten ein Steroid ist.
- 7. Verfahren zur Herstellung von Amidoalkylmaleimiden der allgemeinen Formel II nach einem der Ansprüche 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß man ein eine oder mehrere Carboxylgruppen oder Carboxylderivate tragendes Hapten oder Antigen mit einer Verbindung der allgemeinen Formel I gemäß den Ansprüchen 1-3 in an sich bekannter Weise umsetzt.
- 8. Peptid- oder Proteinkonjugate erhältlich durch Umsetzung von Amidoalkylmaleimiden gemäß einem der Ansprüche 5 oder 6 mit einem eine oder mehrere Sulfhydrylgruppen tragenden Peptid oder Protein.
- Verfahren zur Herstellung von Konjugaten nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Verbindung der allgemeinen Formel II gemäß einem der Ansprüche 5 oder 6 mit einem eine oder mehrere Sulfhydrylgruppen tragenden Peptid oder Protein auf an sich bekannte Weise umsetzt.
- 10. Verwendung von Verbindungen gemäß einem der Ansprüche 1-3 als heterobifunktioneller Linker.
- 11. Verwendung von Verbindungen der Formel II gemäß Anspruch 5 oder 6 zur Herstellung von Peptid- oder Proteinkonjugaten.
- 12. Verwendung von Konjugaten gemäß Anspruch 8 in diagnostischen Bestimmungsverfahren.
- 13. Diagnostisches Mittel enthaltend Konjugate gemäß Anspruch 8 zur Durchführung von immunologischen Bestimmungen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP90/00957

			international Application No PC1/1	2F 30 / 00 3 3 1
		N OF SUBJECT MATTER (If several class		
Accordin	g to Internal	tional Patent Classification (IPC) or to both No	ational Classification and IPC	
Int.	$c1^5 \cdot c$	CO7D 207/452, GO1N 33/535	GOIN 33/547	
			, 6010 33/347 .	•
II. FIELD	S SEARCI			
01104	da - Cuat-	Minimum Docum	entation Searched 7	
Classificat	ion System	<u> </u>	Classification Symbols	
Int.	5	G077 007/00 G01N 33		
Int.	CI	CO7D 207/00, GO1N 33,	700	
		Documentation Searched other		
		to the Extent that such Document	ts are included in the Fields Searched	
				•
				
III. DOC	UMENTS C	ONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citat	ion of Document, 17 with indication, where ap	propriate, of the relevant passages 12	Relevant to Claim No. 13
X	ED	A, 0142193 (AKZO) 22 May	1005	1-17
^	EP,	see pages 17,18, example		
			,	
	ļ	cited in the application		
Α.	Char	ical Abetracts Volume 93	2 No. 19	1
A	Cheil	nical Abstracts, Volume 93 10 November 1980, (Columb		-
		P. Singh et al.: "A solid	Support for affinity	•
	Ì	_		
		chromatography that coval groups via a cleavable co		•
		see page 294, abstract 18		
		Biophys. 1980, 203(2), 77		
		cited in the application	· ·	
		cited in the application		
A	ED	A, 0178125 (MALLINCKRODT)		1–17
•		16 April 1986		
		see the whole document		
A	ਸ਼ਾਹ	A 0158291 (TAKEDA) 16 Oc	tober 1985	1-17
	EP, A, 0158291 (TAKEDA) 16 October 1985 see the whole document;			
		in particular page 15		
		in particular page 15		
A	DE	A, 2310118 (CASELLA) 12 S	September 1974	1-4
		see claims 1-5		
• Specia	l categories	of cited documents: 10	"T" later document published after the or priority date and not in conflic	e international filing date
"A" doc	ument defini	ing the general state of the art which is not e of particular relevance	cited to understand the principle	or theory underlying the
"E" earli	ler documen	t but published on or after the international	invention "X" document of particular relevance	; the claimed invention
filln	g date	n may throw doubts on priority claim(s) or	cannot be considered novel or involve an inventive step	cannot be considered to
whic	ch is cited to	o establish the publication date of another apecial reason (as specified)	"Y" document of particular relevance	the claimed invention
"O" doct	ument referr	ing to an oral disclosure, use, exhibition or	cannot be considered to involve a document is combined with one of	or more other such docu-
	er means ument nublis	thed prior to the international filing date but	ments, such combination being of in the art.	Minys unstand a ni spinkr
		iority date claimed	"&" document member of the same pa	itent family
IV. CERTI	FICATION			
Date of the	Actual Con	npletion of the International Search	Date of Mailing of this international Sea	rch Report
7 Sep	otember	1990 (07.09.90)	8 October 1990 (08.10	0.90)
				`
Internation	al Searching	Authority	Signature of Authorized Officer	ł
Europ	ean Pa	tent Office		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 1985)

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

EP 9000957

SA 37530

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 27/09/90

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
EP-A- 0142193	22-05-85	AU-A- AU-A- EP-A- JP-A- JP-A-	3449784 3449884 0142192 60172932 60172933	26-04-85 26-04-85 22-05-85 06-09-85 06-09-85	
EP-A- 0178125	16-04-86	US-A- AU-B- AU-A- CA-A- JP-A-	4659839 598183 4845185 1257601 61093131	21-04-87 21-06-90 17-04-86 18-07-89 12-05-86	
EP-A- 0158291	16-10-85	JP-A- JP-A- JP-A- US-A-	60214259 60214260 60214261 4816390	26-10-85 26-10-85 26-10-85 28-03-89	
DE-A- 2310118	12-09-74	None	10 4 4 5 a a a b 10 0 0 1		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 90/00957

I. KLAS	SIFIKATIO	N DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei	nehreren Klassifikationssymbolen sind alle an	zugeben) ⁶
Nach	der Internati	onalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der	nationalen Klassifikation und der IPC	
Int.C	5 0 0	07 D 207/452, G 01 N 33/		
II. RECI	HERCHIERT	E SACHGEBIETE		
		Recherchierter M	indestprüfstoff ⁷	
Klassifika	tionssystem		Klassifikationssymbola	
Int.C	1.5	C 07 D 207/00, G 01	N 33/00	
		Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff g unter die recherchierte	ehörende Veröffentlichungen, soweit diese n Sachgabiete fallen ⁸	
-				
IIL EINS	CHLÄGIGE	VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art*	Kennzeicl	nnung der Veröffentlichung 11, soweit erforderlich	unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. 13
х	EP, 2	A, 0142193 (AKZO) 22. Mai 1985		1-17
		siehe Seiten 17,18, Beis er Anmeldung erwähnt 	piel 4	-
A	A Chemical Abstracts, Band 93, Nr. 19, 10. November 1980, (Columbus, Ohio, US), P. Singh et al.: "A solid support for affinity chromatography that covalently binds thiol			
	5	enromatography that cova groups via a cleavable c siehe Seite 294, Zusamme & Arch. Biochem. Biophys er Anmeldung erwähnt	onnector arm", nfassung 182140w,	
A		A, 0178125 (MALLINCKRODT L6. April 1986)	1-17
.	5	siehe das ganze Dokument		
	,		./.	
		10		
"A" Ver def "E" älte	öffentlichung iniert, aber r eres Dokumer	en von angegebenen Veröffentlichungen 10: g, die den allgemeinen Stand der Technik sicht als besonders bedeutsem anzusehen ist nt, das jedoch erst am oder nach dem interna- ledatum veröffentlicht worden ist	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach de meldedatum oder dem Prioritätsdatum ist und mit der Anmeldung nicht kollik Verständnis des der Erfindung zugru oder der ihr zugrundeliegenden Theorie	veröffentlicht worden diert, sondern nur zum ndellegenden Prinzips
"L" Ver	öffentlichung eifelhaft ersci tlichungsdatu	g, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch heinen zu lassen, oder durch die das Veröf- m einer anderen im Recherchenbericht ge- wilchung bejegt werden soll oder die aus einem	"X" Veröffentlichung von besonderer Beder te Erfindung kann nicht als neu oder zu keit beruhend betrachtet werden	utung; die beanspruch- uf erfinderischer Tätig-
"O" Ver	leren besond röffentlichun	eren Grund angegeben ist (wie ausgeführt) g, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen	"Y" Veröffentlichung von besonderer Bede te Erfindung kann nicht als auf erfin ruhend betrachtet werden, wenn die einer oder mehreren anderen Veröffen gorie in Verbindung gebracht wird und	derischer Tätigkeit be- Veröffentlichung mit Hichungen dieser Kata-
"P" Ver	öffentlichun	g, die vor dem Internationalen Anmeldeda- dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffent-	einen Fachmann nahellegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselbe	
IV. BES	HEINIGUN	G		
Datu	m des Absch	usses der internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recher	chenberichts
		otember 1990	0 8. 10. 90	
Inter	nationale Re	cherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächsigten Bediens	teten
		Europäisches Patentamt	H. Ballesteros	

Internationales Aktenzeichen PCT/EP: 90/00957⁻²⁻

Art *	CHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2) Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich umer Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr
A	EP, A, 0158291 (TAKEDA) 16. Oktober 1985 siehe das ganze Dokument; besonders Seite 15	1-17
A	DE, A, 2310118 (CASELLA) 12. September 1974 siehe Ansprüche 1-5	1-4
	·	
	•	•
	·	ર

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9000957 SA 37530

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Patentdokumente angegeben. Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 27/09/90 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichun	
EP-A- 0142193	22-05-85	AU-A- AU-A- EP-A- JP-A- JP-A-	3449784 3449884 0142192 60172932 60172933	26-04-85 26-04-85 22-05-85 06-09-85 06-09-85	
EP-A- 0178125	16-04-86	US-A- AU-B- AU-A- CA-A- JP-A-	4659839 598183 4845185 1257601 61093131	21-04-87 21-06-90 17-04-86 18-07-89 12-05-86	
EP-A- 0158291	16-10-85	JP-A- JP-A- JP-A- US-A-	60214259 60214260 60214261 4816390	26-10-85 26-10-85 26-10-85 28-03-89	
DE-A- 2310118	12-09-74	Keine			